

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

ŠUMARSKI FAKULTET

ŠUMARSKI ODSJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ

URBANO ŠUMARSTVO, ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA

TEA POPOVIĆ

**ULOGA FITOHORMONA PRI GENERATIVNOM RAZVOJU
ŠUMSKOG DRVEĆA**

ZAVRŠNI RAD

ZAGREB, (RUJAN, 2018.)

PODACI O ZAVRŠNOM RADU

Zavod:	Zavod za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku
Predmet:	Fizilogija bilja
Mentor:	izv. prof. dr. sc. Željko Škvorc
Asistent – znanstveni novak:	dr. sc. Krunoslav Sever
Student (-ica):	Tea Popović
JMBAG:	0068216871
Akadska godina:	2017./2018.
Mjesto, datum obrane:	Zagreb,
Sadržaj rada:	Slika: 7 Navoda literature: 10
Sažetak:	<p>Biljni hormoni su male i relativno jednostavne molekule koje se produciraju unutar biljnih organa u vrlo malim koncentracijama. Tri su osnovne skupine hormona koje stimuliraju procese rasta i diferencijacije biljnih organa (auksini, giberelini i citokinini), dok ih apscizinska kiselina i etilen inhibiraju. Pri generativnom razvoju biljaka značajnu ulogu ima i njihova međusobna interakcija. Prema nekim spoznajama i etilen je također uključen u regulaciju generativnog razvoja bilja.</p>

	IZJAVA O IZVORNOSTI RADA	OB ŠF 05 07
		Revizija: 1
		Datum: 25.9.2018.

„Izjavljujem da je moj *završni rad* izvorni rezultat mogega rada te da se u izradi istoga nisam koristila drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni“.

vlastoručni potpis

Tea Popović

U Zagrebu, 25.09.2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Uloga fitohormona pri generativnom razvoju bilja	1
1.2. Auksini	2
1.3. Giberelini	4
1.4. Citokinini	7
1.5. Etilen	10
1.6. Apscizinska kiselina	13
2. OBRADA TEME	17
2.1. Metode i ideje primjenjene u studiji razvoja Velecvjetnog Kukurijeka (<i>Helleborus niger</i> L.)	17
3. ZAKLJUČAK	22
4. LITERATURA	24

1. UVOD

1.1 Uloga fitohormona pri generativnom razvoju bilja

Oblik i funkcioniranje višestaničnih biljaka ili životinja ovisi o komunikaciji među stanicama. U višim biljkama regulacija i koordinacija metabolizma, rasta i morfogeneze često ovisi o kemijskim signalima koji putuju iz jednog dijela biljke u drugi – regulatorima rasta ili biljnim hormonima. Biljni hormoni (fitohormoni) su organski spojevi koji nisu hranjive tvari, a koje biljka sintetizira i pomoću njih regulira i koordinira sve procese u biljci. Zahvaljujući njima razni procesi koji su karakteristični za pojedine faze razvoja prostorno su i vremenski usklađeni. Oni se u stanicama vežu na specifične receptorske proteine. Nastali kompleks hormon-receptor je aktivan oblik hormona. Oni već u vrlo malim količinama (10^{-6} – 10^{-8} M) pospješuju (stimuliraju), koče (inhibiraju) ili na neki drugi način mijenjaju neke fiziološko-biokemijske procese u biljkama. Mjesto postanka i mjesto djelovanja su im različiti. Oni su djelomično učinkoviti i na mjestu postanka (tada ih zapravo ne bismo smjeli nazivati hormonima!). Za razliku od animalnih hormona čiji su učinci vrlo specifični, pojedini biljni hormoni mogu izazvati raznovrsne odgovore ovisno o tkivu u kojem djeluju (Pevalek-Kozlina, B., 2003).

Biljka proizvodi fitohormone u cilju vlastitog reguliranja specifičnih fizioloških procesa u njezinu biološkom ciklusu sve od klijanja sjemena do zriobe plodova i sjemenaka. Najveće količine hormona ustanovljene su u vegetativnim vrhovima stabljike otkuda se dalje odvođe do mjesta „potrošnje“. Prije transporta hormoni se prevode u inaktivni oblik, a za to vrijeme ne iskazuju svoje djelovanje.

Prema dosadašnjim saznanjima uloga fitohormona u rastu i razvoju biljaka temelji se prije svega na tzv. permissijskom djelovanju, tj. u uključivanju gena zbog čega u njihovoj odsutnosti reakcije ne započinju. Biljni hormoni na osnovi svoje specifične međusobne ravnoteže upravljaju procesima razvoja, određujući pravce diferencijacije stanica ili staničja.

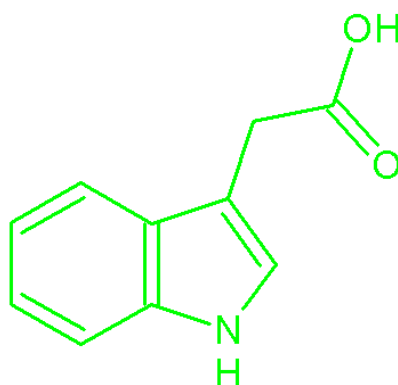
Postoje tri skupine biljnih hormona koje stimuliraju procese (auksini, citokinini i giberelini) i dvije vrste biljnih hormona koji inhibiraju procese (etilen i abscizinska kiselina). Općenito se može reći da biljni hormoni kontroliraju razvoj biljaka djelujući na diobe, produžni rast i diferencijaciju stanica. Tip odgovora na pojedini biljni hormon ovisi

o njegovoj koncentraciji, te o vrsti i razvojnem stadiju biljnoga tkiva ili organa biljke ne koji djeluju. Biljni hormoni sintetiziraju se u vrlo malim količinama, no i tako niske koncentracije dovoljne su da izazovu određeni odgovor. Hormoni mogu djelovati na aktivnost pojedinih gena i postojećih enzima te mijenjati svojstva plazmatskih membrana. Svako od tih djelovanja može uzrokovati promjene u metabolizmu i razvoju stanice. Treba istaknuti da reakcija na pojedini biljni hormon ne ovisi toliko o njegovoj apsolutnoj koncentraciji koliko o odnosu koncentracija svih prisutnih hormona (Škvorc i dr., 2013).

1.2 Auksin

Auksini su prvi otkriveni regulatori rasta. Krajem 19. st. Charles Darwin je istraživao pojavu fototropizma na sijanicama kanarske trave (*Phalaris canariensis*), te je otkrio da vršak koleoptile prvi „osjeća“ svjetlosni podražaj, ali se savijanje zbiva nekoliko milimetara ispod vrška. Boysen-Jansen je tridesetak godina kasnije zaključio da je zakrivljenje koleoptile rezultat nesrazmjernog produženog rasta, odnosno da je produženi rast jači na zasjenjenoj strani. Njegovo opažanje potvrdilo je postojanje tvari koja se sintetizira u vršku koleoptile i difuzijom putuje prema donjem dijelu. Went je nastavio istraživanja s koleoptilama zobi. Uklanjanjem vrška, daljnji rast koleoptile je prekinut. Odrezane vrškove koleoptile stavljao je na agarSKU ploču, te ih nakon nekog vremena uklonio, a agarSKU ploču izrezao na blokove koje je koristio za poticanje rasta u koleoptilama bez vrška. Njegov pokus predstavlja prvo odjeljivanje biljnog hormona, a također je pružio mogućnost za kvantitativna mjerenja kojima se može pratiti koncentracija auksina i obrnuto. Danas to predstavlja jedan od biotestova za istraživanje auksinske prirode određene nepoznate tvari (Pevalek-Kozlina, B., 2003).

Naziv auksin je grčkog porijekla (auxien), a znači rasti. Sredinom 30-ih godina 20. st. otkriven je kemijski sastav auksina. Utvrđeno je da je auksin indol-3-octena kiselina (IAA) koja se javlja kao normalni produkt metabolizma triptofana. Indol-3-octena kiselina je najvažniji i najobilniji prirodni auksin (Slika 1). Kasnije su otkriveni i drugi prirodni auksini, npr. 4-klorindol-3-octena kiselina (4-Cl-IAA) i feniloctena kiselina (PAA).



Slika 1. Struktura auksina

(izvor: <http://www.znanje.org/i/i25/05iv02/05iv0211fll/index2.htm>)

Glavna mjesta nastanka IAA u višim biljkama su meristemska tkiva i tkiva embrija, te fotosintetizirajući organi. IAA može biti prisutna i u spremišnim tkivima, npr. endospermu i supkama, te koleoptilama i peludu.

Danas se proizvode i brojni sintetski auksini koji imaju široku primjenu u agrikulturi i hortikulturi. Prvi sintetski auksini bili su spojevi vrlo slični IAA po tome što su imali indolski prsten. To su bili npr. indol-3-propionska kiselina, indol-3-maslačna kiselina (IBA) i indol-3-piruvatna kiselina. No, mnogi sintetski auksini su strukturno jako različiti od IAA, a mnogi od njih djelotvorniji su od IAA. Takvi su npr. auksini klorofenoksiotene kiseline, 2,4-diklorofenoksiotena kiselina (2,4-D), 2,4,5-triklorofenoksiotena kiselina (2,4,5-T) i 2-metil-4-klorofenoksiotena kiselina (MCPA) koji nisu indolski spojevi. Sintetski auksini komercijalno se koriste za pospješivanje zakorjenjivanja reznica, izazivanje partenokarpije, ubrzavanje zriobe plodova, sprječavanje otpadanja plodova prije dozrijevanja, te kao herbicidi (Pevalek-Kozlina, B., 2003).

Auksini djeluju i na sekundarni rast inducirajući stanične diobe u vaskularnom kambiju, te na diferencijaciju sekundarnog ksilema. Nadalje, stimuliraju razvitak adventivnog korijenja na reznoj plohi stabljike. Auksin koji se sintetizira u začecima listova odgovoran je za razvitak provodnog tkiva lista koje će se spojiti s provodnim elementima stabljike, a auksini koji se sintetiziraju u sjemenkama stimuliraju rast plodova brojnih biljnih vrsta. Učinci auksina ovise o brojnim čimbenicima, uključujući razvojni stadij tkiva ili organa, koncentraciju i vrstu auksina (prirodni ili sintetski) (Škvorec i dr., 2013).

U djelovanju auksina mogu se razlikovati dvije faze: brza stimulacija rasta u kojoj može posredovati tok protona i promjena koncentracije iona kalcija u citosolu i aktivacija ili represija specifičnih gena. Unatoč brojnim istraživanjima, mehanizam djelovanja auksina još uvijek nije potpuno jasan. Jedna od poteškoća je u tome da se učinci različitih hormona međusobno podudaraju i dopunjavaju. Druga poteškoća u razjašnjavanju mehanizma auksinskog djelovanja, kao i djelovanja drugih regulatora rasta, jest velik broj fizioloških procesa koje oni kontroliraju. Najvažnije činjenice o mehanizmu djelovanja auksina su sljedeće:

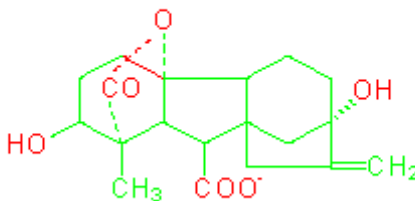
1. Svi fiziološki odgovori potaknuti auksinom traže trajnu prisutnost hormona. U slučaju produživanja stanica koleoptile induciranog auksinom, već unutar prvih 10 do 15 min, uočava se povećanje stope rasta. Nakon uklanjanja auksina, stopa rasta se već u prvim minutama smanjuje, a nakon 40 min vraća se na kontrolnu razinu.
2. Auksini su djelotvorni u izrazito niskim koncentracijama. Npr. već koncentracije od 10^{-6} M mogu aktivirati određene enzime ili stimulirati sintezu nekih enzima, te uzrokovati promjene u membranskoj propustljivosti.
3. Sposobnost auksina da poveća stopu staničnog produživanja ovisna je o sintezi nove RNA i proteina. Kontinuirana sinteza RNA, posebice mRNA i proteina nije neophodna na samom početku rasta, ali u kasnijim fazama je nužna.
4. Odgovor na auksin je prebrz da bi uključivao aktivaciju gena kao primarno djelovanje. Npr. produživanje koleoptila i dijelova stabljike zbiva se za manje od 10 minuta, dok se jače strujanje citoplazme može opaziti već unutar prvih 20 sekundi do nekoliko minuta, a promjene u membranskoj propustljivosti tijekom prvih 10 do 15 min ili čak ranije.

1.3 Giberelini

Otkriće skupine biljnih hormona, danas poznatih pod nazivom giberelini, potječe iz 1926. godine, kada je Kurosawa počeo istraživati oboljenje riže koje je bilo vrlo često u Aziji. Ta je bolest bila poznata još krajem 19. st. pod nazivom "bolest ludih biljčica". Kurosawa je dokazao da se u filtratu kultiviranih gljivica nalazi tvar koju je nazvao giberelinom, a koja na rast biljaka riže ima slično djelovanje kao i infekcija gljivicom.

Japanski znanstvenici su od 1935. do 1938. g. uspjeli iz filtrata kulture gljivice *Gibberella* izolirati kristale dviju tvari koje su imale snažno djelovanje na produžni rast i nazvali ih giberelinom A i giberelinom B. 1958. godine prvi put je izoliran i kemijski identificiran prirodni giberelin iz nezrelih sjemenki graha (*Phaseolus coccineus*), bio je to GA₁. Danas se zna da su giberelini prirodno prisutni u velikom broju vrsta kritosjemenjača i golosjemenjača. Poznato je više od stotinu različitih giberelina koji se označavaju brojevima prema redoslijedu njihova otkrića (GA₁, GA₂,...,GA_x), a od kojih je otprilike trećina fiziološki aktivna. Istraživanja su pokazala da su giberelini osobito aktivni u stimuliranju staničnih dioba i produžnog rasta patuljastih biljaka i biljaka s rozetom. Osnova biološkog testa za dokazivanje giberelina je stimulacija produžnog rasta (Dubravec i Regula, 1995).

Giberelini su po kemijskom sastavu diterpeni. To je velika skupina srodnih spojeva koji u molekuli imaju *ent*-giberelanski kostur sastavljen od četiri prstena (A,B,C, i D). U biljnim tkivima giberelini mogu biti prisutni kao molekule s 20 C-atoma (C₂₀-giberelini) i molekule s 19 C-atoma (C₁₉-giberelini).



Slika 2. Struktura giberelina

(Izvor: <http://www.znanje.org/i/i25/05iv02/05iv0211fl/index3.htm>)

Mladi listovi vršnog pupa glavno su mjesto sinteze giberelina. Sinteza giberelina zbiva se i u vrškovima korijena, ali je ograničena samo na vršnih 3 do 4 mm. Nezrele sjemenke predstavljaju također bogati izvor giberelina. Vrlo je malo podataka o mjestima sinteze u zrelih sjemenkama. Na biosintezu i metabolizam giberelina snažno utječu okolišni čimbenici kao što su niska temperatura i duljina dana. Izlaganje niskim temperaturama nužno je za klijanje sjemenki ili za cvjetanje nekih biljaka. U sjemenkama lijeske (*Corylus avellana*) razdoblje hladnoće, primjerice dovodi do povećanja sadržaja giberelina za 60-80 puta (Pevalek-Kozlina, B., 2003).

Giberelini i njima slični spojevi su prisutni u kritosjemenjačama i golosjemenjačama, papratnjačama, smeđim i zelenim algama, gljivama i bakterijama. U svakom organu ili tkivu postoje dvije ili više vrsta giberelina. Vrsta, razina i stanje (slobodni ili vezani giberelin) mijenjaju se tijekom biljnog razvitka.

Giberelini, kao i drugi regulatori rasta, imaju mnogostruko djelovanje. Učinci izazvani giberelinima donekle nalikuju onima koje izazivaju auksini, npr. pospješuju produžni rast i izazivaju partenokarpiju u jabuke. Najočitiiji učinak giberelina je poticanje produžnog rasta stabljike i to posebice u genetski uslovljenih patuljastih mutanata i biljaka s rozetom, te cvjetanje dvogodišnjih i drugih biljaka koje zahtijevaju vernalizaciju i/ili indukciju dugim danom da bi mogle cvjetati. No, postoje i brojna druga fiziološka djelovanja giberelina, npr. kontrola klijanja sjemenki, uključujući prekid dormancije i indukciju sinteze hidrolitičkih enzima, te kontrola prijelaza iz juvenilne u odraslu fazu ili obrnuto.

Primjena giberelina može regulirati i prijelaz iz juvenilne u odraslu i prijelaz iz odrasle u juvenilnu fazu. Npr. u bršljana (*Hedera helix*), GA₃ može potaknuti rejuvenilizaciju, tj. promjenu iz odraslog u juvenilno stanje, dok se mnoge juvenilne četinjače mogu potaknuti na ulazak u reproduktivnu fazu primjenom nepolarnih giberelina, npr. GA₄ + GA₇. Giberelini prekidaju dormanciju vršnih pupova u proljeće. Naime, kako u jesen dani postaju kraći, izdanci drveća umjerenog područja pripremaju se za razdoblje mirovanja. Tijekom skraćivanja dana inhibitori se koncentriraju u pupovima i spriječavaju njihovu aktivnost. Inhibicija se tijekom zimske hladnoće polako prevladava, a u izdancima se počinju nakupljati tvari koje potiču aktivnost pupova, među koje se ubrajaju se i giberelini. Izlaganjem pupova niskim temperaturama povisuje se endogena razina giberelina. Kao što je i za očekivati, dormantnost pupova se može prekinuti egzogeno dodanim giberelinom. I u dormanciji pupova i u dormanciji sjemenki giberelini djeluju antagonistički s apscizinskom kiselinom. Sjemenke brojnih biljnih vrsta kliju isključivo u točno odedenim okolišnim uvjetima, dormancija ovakvih sjemenki često se može prekinuti primjenom giberelina. Egzogeno primjenjeni giberelin može ne samo pospješiti klijanje, nego ga u mnogim slučajevima i omogućiti kada nisu prisutni potrebni okolišni uvjeti. Tako npr. lješnjaci moraju odedeno razdoblje biti izloženi niskoj temperaturi da bi mogli proklijati. Ovo razdoblje hladnoće može se zamijeniti primjenom giberelina. Sjemenke koje u normalnim uvjetima trebaju svjetlost za klijanje mogu djelomično klijeti i u tami ako se tretiraju giberelinom. Mnoge sjemenke sadrže visoke koncentracije giberelina, osobito embryo. Nakon inhibicije

vodom, otpuštanje giberelina iz embrija predstavlja signal za prekid dormancije i početak klijanja. U prirodnim uvjetima, giberelini u sjemenkama vjerojatno predstavljaju vezu između okolišnog signala i početka rasta embrija (Pevalek-Kozlina, B., 2003).

Teško je reći na kojoj razini giberelini djeluju. Mnogo toga govori da je utjecaj na svojstva i građu stanične stijenke primarni učinak koji se očituje već nekoliko minuta nakon primjene giberelina. Još uvijek ne postoje dokazi djeluje li giberelin neposredno na razini transkripcije, na postranskripcijskoj razini ili na razini translacije. Pretpostavlja se da se receptor za giberelin nalazi u plazmatskoj membrani aleuronskih stanica, a vezanjem giberelina na taj receptor šalje se signal u jezgru.

Giberelini se često komerijalno koriste u proizvodnji voća (povećavaju veličinu bobica, razvoj plodova bez sjemenki, odgađaju starenje plodova citrusa), u proizvodnji slada iz ječma (povećana proizvodnja uslijed povećanja razine α -amilaze), za povećanje prinosa šećerne trske (stimuliraju produživanja internodija u zimskom razdoblju), koriste se za produživanje stajljike dvogodišnjih biljaka (npr. repe i kupusa), u oplmenjivanju (ubrzavaju ulazak četinjača u reproduktivnu fazu), pospješuju razvitak muških cvjetva itd.

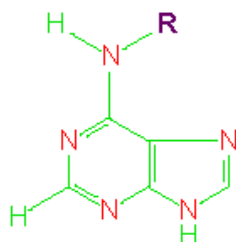
1.4 Citokinini

Citokinini su regulatori rasta koji pospješuju diobu stanica (citokinezu), ali djeluju i na brojne druge fiziološke i razvojne procese u biljkama u koje nije nužno uključena dioba stanica, npr. odgađanje starenja u odvojenim organima, mobilizaciju hranjivih tvari, sazrijevanje kloroplasta, povećavanje kotiledona i kontrolu morfogeneze.

Otkriće citokinina rezultat je istraživanja u kulturi tkiva provedenih početkom 40-ih godina 20. stoljeća. F. Skoog i njegovi suradnici koristili su aseptičke kulture tkiva zrele srčike duhana (*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin No. 38), potičući diobu parenhimskih stanica dodavanjem različitih tvari u hranjivu podlogu. Testirali su niz tvari, uključujući i stari uzrak DNA iz sperme haringe, koji se okazao djelotvornim u poticanju rasta. Iz autoklaviranog uzorka DNA sperme haringe izoliran je 6-furfurilaminopurin ($C_{10}H_9N_5O$) nazvan kinetin. Molekula kinetina je modificirani oblik adenina, sastojka DNA. Iako se kinetin kao takav ne pojavljuje u prirodi nego je nusprodukt razgradnje DNA inducirane zagrijavanjem, to je otkriće upućivalo na zaključak da prirodno postoje molekule strukturno slične kinetinu koje mogu regulirati aktivnost staničnih dioba u biljkama. To je ubrzo potvrđeno otkrićem prirodnih citokinina zeatin, izopentenil-adenina, zeatin-ribozida

i dr. D.S. Letham i C.O. Miller su 1963.g. neovisno jedan o drugom, iz nezrelog endosperma kukuruza izolirali kristalični oblik prirodnog citokinina kojeg su nazvali zeatin. Letham i suradnici su utvrdili da je zeatin najvjerojatnije 6-(4-hidroksi-3-metilbut-2-enilamino) purin, što je ubrzo potvrđeno. Danas su zeatin, te njegov ribozid i ribotid nađeni u brojnim biljnim vrstama. Zeatin i kinetin su strukturno slični, a razlikuju se po bočnom lancu. To su derivati adenina (aminopurina) s bočnim lancem vezanim na N⁶-atom. Kako bočni lanac zeatina ima dvostruku vezu on može postojati u *cis* i *trans* konfiguraciji, a oba oblika su biološki aktivna. U viših biljaka prisutna je *trans* konfiguracija. Zeatin je nađen u brojnim biljkama i nekim bakterijama. Osim zeatina, najzastupljenijeg citokinina u višim biljkama izolirani su i drugi supstituirani adenini koji pokazuju aktivnost citokinina, npr. dihidrozeatin i izopentenil-adenin kao i njihovi derivati koji se razlikuju po bočnom lancu ili po tome što je on vezan na C-atom br.2. Svi citokinini koji se javljaju kao prirodni su derivati izopentenil-adenina. Citokinini su nađeni u kritosjemenjačama, golosjemenjačama, papratnjačama i algama (Dubravec i Regula, 1995).

Svi poznati prirodni citokinini su po kemijskom sastavu N⁶-supstituirani derivati adenina, koji imaju bočni lanac od 5 C-atoma vezan na C-atomu br.6 adenina (slika 3). Danas su poznati brojni prirodni citokinini, a proizvode se i sintetski spojevi koji pokazuju citokininsku aktivnost. Gotovo svi sintetski spojevi koji pokazuju citokininsku aktivnost su N⁶-supstituirani derivati adenina. Sintetski citokinin je npr. benzil-adenin (BA) koji u bočnom lancu ima prstenasti sustav. Iznimka su neki derivati difenirulee koji pokazuju slabu citokininsku aktivnost. Ne zna se zašto su oni aktivni, ali moguće je da stimuliraju biosintezu prirodnih citokinina. Neki od tih sintetskih citokinina su barem isto tako aktivni kao prirodni, ako ne i jače. Benzil-adenin je npr. u nekim biotestovima aktivniji čak i od najjačeg prirodnog citokinina, zeatina (Pevalek-Kozlina, B., 2003).



Slika 3. Struktura Citokinina

(Izvor: <http://www.znanje.org/i/i25/05iv02/05iv0211fll/index4.htm>)

Glavna mjesta sinteze slobodnih citokinina u biljkama su vršni meristemi korijena. Osim toga, citokinini se sintetiziraju u embrijima i plodovima. Tijek biosinteze citokinina je vrlo složen i još uvijek nije u potpunosti poznat. Složenost proizlazi uglavnom iz činjenice da se citokinini ne javljaju samo kao slobodne baze, nego i vezani u obliku ribozida u kojima je šećer riboza vezan na N⁹ atom purinskog prstena, ribotida u kojih je polovica riboze esterificirana s fosfatnom kiselinom i glikozida u kojima je molekula glukoze vezana na N⁷ ili N⁹-atom purinskog prstena ili na atom kisika u bočnom lancu zeatina ili dihidrozeatina. Prirodni citokinini postoje također i kao modificirane baze određenih molekula tRNA. Nakon hidrolize tRNA neke od tih baza djeluju kao citokinini.

Citokinini nastaju kondenzacijom adenina s odgovarajućim davateljem N⁶-supstituenta. Bočni lanci prirodnih citokinina kemijski su srodni s karotenoidima, giberelinima, apscizinskom kiselinom i nekim zaštitnim biljnim spojevima (fitoaleksini). Citokinini su jedinstveni među biljnim hormonima po tome što imaju istovjetnu adeninsku strukturu kao i nukleinske kiseline. Posebno je zanimljivo da se određeni citokininski aktivni ribonukleozidi javljaju kao komponente nekih vrsta tRNA. 1960.g. Thimann i Laloroya su prvi - na temelju dokaza da citokinini stimuliraju sintezu RNA i proteina i da egzogeno dodani citokinini često imaju strogo lokalizirane učinke kada se primjene na čitavu biljku ili biljne organe, pretpostavili da se citokinini mogu brzo ugrađivati u makromolekule kao što je RNA.

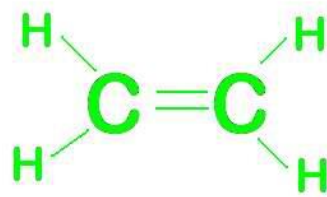
Mnoga biljna tkiva sadrže enzim citokinin-oksidadu koji pretvara zeatin, zeatin-ribozid i izopentenil-adenin u adenin i njegove derivate. Taj enzim inaktivira hormon i vjerojatno je važan u reguliranju učinaka citokinina. Citokinin-oksidaza ne djeluje na sintetske citokinine, što objašnjava njihov dulji životni vijek u staničnim kulturama. Većina citokinina se u biljnim tkivima brzo pretvara u nukleotide ili glikozide. Citokininski glikozidi su vjerojatno pričuveni oblik citokinina. Dormantne sjemenke često sadrže visoke razine citokininskih glikozida i vrlo niske razine hormonskih aktivnih slobodnih citokinina. Nakon početka klijanja povećava se razina slobodnih citokinina, a smanjuje razina citokininskih glikozida. Slobodni citokinini se sintetiziraju u vršnom dijelu korijena, te embrijima i plodovima. Iz korijena se ksilemom prenose u izdanak. Okolišni čimbenici koji interferiraju s funkcijama korijena, npr. vodni stres, smanjuju sadržaj citokinina u ksilemskom soku. Citokinini se kroz ksilem prenose pasivno – transpiracijskom strujom zajedno s vodom i mineralnim tvarima. U ksilemu se nalaze

pretežno u obliku zeatin-ribozida pa se pretpostavlja da je to glavni oblik u kojem se prenose (Pevalek-Kozlina, B., 2003).

Različitošć učinaka citokinina na biljni rast i razvitak povezana je s putovima provođenja signala koji dovode do specifičnih odgovora. Iako su saznanja kako citokinini djeluju na staničnoj i molekularnoj razini još uvijek nepotpuna, pretpostavlja se da postoje dva receptora za citokinin. Jedan od njih je citosolni receptor koji putuje u jezgru, a drugi je na plazmatskoj membrani. Citokinini se s visokom specifičnošću mogu vezati na izolirane ribosome viših biljaka. Mehanizam djelovanja citokinina nije u potpunosti poznat, ali se na temelju njihovog učinka na stopu sinteze i vrstu proteina pretpostavlja da djeluju na ekspresiju gena.

1.5 Etilen

Etilen (C_2H_4) je jednostavna organska molekula. To je plinoviti spoj koji može djelovati kao regulator rasta na biljku u kojoj se sintetizirao i kao feromon na susjedne biljke iste ili različitih vrsta. Već u 19.st. uočeno je da etilen koji se koristio kao rasvjetni plin ima brojne učinke na rast i razvitak biljaka. Drveće koje je raslo u blizini etilenskih svjetiljki gubilo je listove brže nego ostalo drveće. Ruski fiziolog D. Neljubow još je kao student uočio da etilen uzrokuje trostruki odgovor etioliranih sijanaca graška: inhibiciju produživanja stabljike, povećavanje promjera i vodoravnu orijentaciju stabljike. Nekoliko godina kasnije H.H. Cousins je uočio da nepoznati hlapljivi spoj iz naranača uzrokuje prerano sazrijevanje banana. To je bila prva indikacija da je etilen prirodni produkt biljnih tkiva. I drugi su istraživači uočili da etilen stimulira sazrijevanje plodova. Kasnih tridesetih godina 20.st. dokazano je da se etilen razvija iz mnogih biljnih dijelova, posebice mesnatih plodova. 1934. g. etilen je kemijski identificiran kao prirodni produkt biljnog metabolizma, a zbog svojih učinaka uvršten u regulatore rasta. Sljedećih 20-ak godina etilen se vrlo slabo istraživao što je bila posljedica kako vjerovanja da su učinci etilena posredovani s auksinom, tako i nedostatka tehnika za analizu relativno malih količina plina u biljnim tkivima (Pevalek-Kozlina, B., 2003).



Slika 4. Struktura etilena

(Izvor: <http://www.znanje.org/i/i25/05iv02/05iv0211fll/index6.htm>)

Etilen je najjednostavniji olefin i u fiziološkim je uvjetima lakši od zraka. Zapaljiv je i lako oksidira u etilen koji se može potpuno oksidirati do ugljikova dioksida. Etilen se lako otpušta iz biljnih tkiva i difuzijom kroz međustanične prostore izlazi iz tkiva. Etilen je prirodni produkt biljnog metabolizma koji proizvode i zdrava i stara i bolesna tkiva. Stopa sinteze etilena ovisi o vrsti tkiva i razvojnem stadiju. Proizvodnja etilena se povećava tijekom otpadanja listova i starenja cvjetova kao i tijekom dozrijevanja plodova. Etilen proizvode kritosjemenjače, golosjemenjače, papratnjače, mahovine, jetrenjarke i neke cijanobakterije te gljive.

Budući da je etilen plin i može izlaziti iz tkiva donedavno se nije razmišljalo posjeduju li biljke mehanizam za razgradnju etilena. No danas se zna da biljke mogu metabolizirati etilen do ugljikova dioksida, etilen oksida i etilen glikola koji se može konjugirati s glukozom. Etilen kontrolira procese u završnim stadijima razvitka i stresnim uvjetima. Ponekad, etilen i auksini mogu uzrokovati iste odgovore, npr. indukciju cvjetanja kod ananasa i inhibiciju produživanja stajljike, sugerirajući time da su možda neki odgovori koji se pripisuju auksinima zapravo posredovani etilenom.

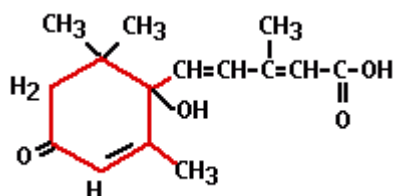
Dozrijevanjem plodova stopa sinteze etilena se povećava. To je povezano s povišenjem razine ACC i povećanjem aktivnosti ACC-sintetaze i ACC-oksidade te povećanjem razine mRNA za ACC-sintetazu i ACC-oksidadu. Etilen uzrokuje promjene u membranskoj propustljivosti i otpuštanje enzima povezanih s procesima dozrijevanja. Inhibitori biosinteze etilena ili njegovog djelovanja mogu odgoditi ili spriječiti dozrijevanje. Etilen i njegov prekursor ACC ubrzavaju početak starenja listova i cvjetova. Povećana proizvodnja etilena povezana je s gubitkom klorofila. Inhibitori sinteze etilena ili njegova djelovanja odgađaju početak starenja. Starenje je regulirano ravnotežom razina etilena i citokinina iako apscizinska kiselina ima određenu ulogu (Dubravec i Regula, 1995).

Etilen stimulira otpadanje listova. Brojni defolijanti uključujući neke herbicide auksinskog tipa djeluju potičući proizvodnju etilena. Otpadanje listova svake jeseni predstavlja prilagodbu koja sprječava isušivanje drveća zimi kada korijen ne može primati vodu iz zamrznutog tla. Prije nego što listovi otpadnu, brojne se hranjive tvari iz listova usmjeravaju u pričuvna tkiva stabla odakle se idućeg proljeća vraćaju u nove listove. U fazi zadržavanja listova na biljci tj. prije percepcije signala koji potiče proces otpadanja, list je zdrav i potpuno funkcionalan. Auksin sprječava apsciziju održavajući stanice rastavnog sloja u stanju neosjetljivom na etilen. Nakon primanja signala za apsciziju, razina auksina se počinje smanjivati, a razina etilena povećavati. Etilen i postupci koji pospješuju starenje smanjuju razinu auksina smanjujući stopu njegove sinteze i prijenosa te povećavajući stopu razgradnje. Uslijed smanjivanja koncentracije slobodnog auksina povećava se sposobnost specifičnih ciljnih stanica da odgovore na etilen.

Etilen je uključen i u procese dormancije pupova i sjemenki. Brojni su dokazi koji pokazuju da egzogeni etilen potiče klijanje, što navodi na zaključak da povećana koncentracija endogenog etilena može igrati važnu ulogu u dormantnosti sjemenki. Nedormantne sjemenke u aerobnim uvjetima sintetiziraju etilen dok se u dormantnim sjemenkama stvaraju samo male količine etilena, što znači da dormancija sjemenki ove vrste može biti uzrokovana nemogućnošću sinteze etilena. U relativno visokim koncentracijama etilen može potaknuti razvoj adventivnog korijenja na listovima, stabljici, cvjetnim stapkama i drugom korijenju. U nekim biljnim vrstama etilen potiče pojačani razvitak korijenovih dlačica. Etilen se veže na receptor koji se nalazi na plazmatskoj membrani. Ovo povezivanje aktivira jedan ili više putova provođenja signala koji dovode do staničnog odgovora. Etilen regulira transkripciju djelujući na ekspresiju gena koji kodiraju enzime uključene u razgradnju stanične stijenke. Etilen povećava razinu transkripcije brojnih gena, uključujući gene koji kodiraju enzime celulazu, hitinazu, β -1,3-glukanazu i peroksidazu. Etilen se komercijalno koristi za ubrzavanje dozrijevanja plodova jabuke i rajčice, gubitak zelene boje limuna, sinkroniziranje cvjetanja i oplodnje ananasa, te ubrzavanje otpadanja cvjetova i plodova (Öpik, H., Rolfe, S., 2005).

1.6 Apscizinska kiselina

Do otkrića apscizinske kiseline kao prirodnog inhibitora rasta došli su neovisnim istraživanjima u SAD gdje su 60-ih godina 20.st. istraživane prirodne tvari koje ubrzavaju otpadanje listova, i u Velikoj Britaniji gdje su proučavani prirodni inhibitori povezani s dormancijom pupova drvenastih vrsta. 1965.g. obje su se grupe istraživača složile da se radi o istoj tvari. Iz suhih, zrelih tobolaca pamuka izolirana je kristalinična tvar koja je ubrzavala otpadanje peteljki pamuka, a nazvana je „apscizin I“. 1963.g. je iz nezrelih plodova pamuka izolirana tvar koja je ubrzavala otpadanje listova, a koja je nazvana „apscizin II“. Za tu tvar predložena je empirijska formula $C_{15}H_{20}O_4$. Iste je godine iz listova breze izolirana tvar koja potiče dormanciju aktivno rastućih sijanaca, a nazvana je „dormin“. Ubrzo je utvrđeno da su „apscizin II“ i „dormin“ istovjetni spojevi koji su zbog svog djelovanja na otpadanje preimenovani u apscizinsku kiselinu. Po kemijskom sastavu apscizinska kiselina je terpenoid. Struktura apscizinske kiseline nalik je na terminalni dio nekih karotenoidnih molekula. Apscizinska kiselina sadrži 15 C-atoma koji čine alifatski prsten s jednom dvostrukom vezom, tri metilne skupine i jedan nezasićeni lanac s terminalnom karboksilnom skupinom. Orijentacija karboksilne skupine na C-atomu br.2 određuje *cis* ili *trans* izomere. Gotovo sva apscizinska kiselina u prirodi prisutna je u *cis* obliku.



Slika 5. Struktura molekule apscizinske kiseline

(Izvor: <http://www.gnojidba.info/biostimulatori/fitohormoni-apscizenska-kiselina/>)

Za detekciju apscizinske kiseline koriste se različiti biotestovi: inhibicija rasta koleoptile, inhibicija klijanja, inhibicija sinteze α -amilaze u aleuronskom sloju sjemena ječma inducirana giberelinima, indukcija otpadanja listova i zatvaranje puči. U istraživanjima apscizinske kiseline koriste se metode visokotlačne tekućinske kromatografije (HPCL), plinske kromatografije i imunološke tehnike.

Apscizinska kiselina je najprije nađena u listovima drvenastih vrsta *Acer pseudoplatanus* i *Betula pubescens*, te u plodovima pamuka. Ubrzo je otkriveno da je prisutna i u drugim biljnim vrstama. Nađena je u svih kritosjemenjača i golosjemenjača kao i u nekih papratnjača i mahovina. U biljkama je ABA prisutna u svim glavnim organima, od korijenove kape do vršnog meristema. Odgovor na apscizinsku kiselinu ovisi o njezinoj koncentraciji unutar tkiva i osjetljivosti tkiva na hormon. ABA se kao i giberelin sintetizira iz mevalonske kiseline preko farnezil-pirofosfata. Kako ta dva hormona imaju antagonističke fiziološke i biokemijske učinke, od posebnog je interesa objašnjenje enzimske regulacije koja određuje relativne odnose biosinteze giberelina i ABA. Put sinteze apscizinske kiseline počinje s izopentenil-pirofosfatom (IPP) i dovodi do sinteze ksantofila violaksantina koji ima 40 C-atoma. Violaksantin se pretvara u 9'-*cis*-neoksantin od kojeg cijepanjem nastaje ksantoksin, spoj s 15 C-atoma. Ksantoksin se u citosolu preko međuspoja ABA-aldehida pretvara u apscizinsku kiselinu (Pevalek-Kozlina, B., 2003).

O razgradnji apscizinske kiseline zna se više nego o njezinoj sintezi. Povišeni sadržaj ABA u biljnim tkivima prisutan u uvjetima vodnog stresa, nakon dovođenja vode brzo se smanjuje. ABA se oksidira do nestabilnog međuspoja 6-hidroksimetil-ABA koji se brzo pretvara u fazeinsku i dihidrofazeinsku kiselinu. Daljnji tijek razgradnje nije u potpunosti poznat. Ovi učinci upućuju na zaključak da se fazeinska kiselina može vezati na receptore za apscizinsku kiselinu. Dihidrofazeinska kiselina u biotestovima nema nikakve učinke. Svi dosad poznati produkti razgradnje, kao i ABA sama mogu se vezati na estere s glukozom. Slobodna ABA može se inaktivirati konjugacijom s drugim molekulama npr. monosaharidima.

Kao i ostali regulatori rasta, ABA ima višestruke fiziološke učinke na rast i razvoj viših biljaka. Primarna uloga apscizinske kiseline je u poticanju i održavanju dormantnosti sjemenki i pupova, te odgovoru biljaka na stres, posebice vodni. Osim toga ABA utječe i na brojne druge procese u biljkama djelujući najčešće kao antagonist auksina, citokinina i giberelina.

Apscizinska kiselina, kao i etilen, kontrolira procese karakteristične za završne razvojne stadije biljaka (starenje, otpadanje listova, venuće cvjetova, dozrijevanje plodva). Osim toga, kontrolira stopu rasta u nepovoljnim uvjetima inhibirajući rast, sintezu bjelančevina i transport iona (Škvorec i dr., 2013).

Biljke nemaju živčani sustav, a komunikacija među stanicama odvija se preko glasnika (kemijskih tvari) tj. fitohormona. To su organske tvari (koje nisu hranjive tvari) koje biljka sintetizira i pomoću njih regulira i koordinira sve procese u biljci. Oni već u malim količinama reguliraju fiziološkobiokemijske procese rastenja u smislu aktivacije (stimuliranja) ili inhibicije (kočenja). U životnom ciklusu biljaka dolazi do različitih fizioloških i biokemijskih procesa koji utječu na vegetativni i generativni razvoj, te morfološka svojstva biljaka. Pod razvitkom biljaka podrazumijeva se generativni rast koji obuhvaća tvorbu generativnih organa, oplodnju i razvitak ploda. Giberelini mogu nadomjestiti djelovanje niskih temperatura i inducirati stvaranje cvjetova u uvjetima u kojima se oni normalno ne bi stvarali kod brojnih biljnih vrsta, prije svega biljaka s rozetom. Također mogu potaknuti cvjetanje u biljaka dugog dana npr. vrste *Hyoscyamus niger*. U monoceičnih biljaka koje imaju jednospolne cvjetove s oba spola na istoj biljci npr. kukuruza, ili diecičnih biljaka koje imaju jednospolne cvjetove na odvojenim biljkama npr. konoplje, giberelini induciraju razvoj cvjetova određenog spola. U konoplje giberelini potiču pojačano stvaranje muških cvjetova, a u kukuruza pojačano stvaranje ženskih cvjetova. Za razliku od giberelina etilen kod većine vrsta inhibira cvjetanje, ali ga u ananasa i drugih vrsta iz porodice *Bromeliaceae* kao i u manga, potiče. U biljaka koje imaju odvojene muške i ženske cvjetove etilen može promijeniti spol cvjetova koji se razvijaju. Tako npr. u krastavca, etilen može potaknuti pojačan razvitak ženskih cvjetova. Auksini imaju brojne učinke na biljni rast i morfogenezu. Oni stimuliraju produžni rast stabljike i koleoptila, ali u istoj koncentraciji inhibiraju produživanje korijena. Osim toga, stimuliraju stanične diobe u stabljici, ali ih mogu inhibirati u bočnim pupovima. Razvitak plodova može također ovisiti o prisutnosti auksina. Auksin se stvara u peludu, te embriju i endospermu plodova koji se razvijaju. Početni poticaj za rast ploda može biti rezultat oplodnje. Nakon oplodnje rast ploda može ovisiti o auksinu koji se stvara u sjemenci. Plod auksinom u prvim stadijima rasta opskrbljuje endosperm, a u kasnijim razvojnim stadijima embrio. U nekih vrsta biljaka, kao što je npr. jabuka, prisutna je partenokarpia tj. razvitak plodova bez oplodnje. Takvi plodovi nemaju sjemenke. To se može dogoditi spontano ili uslijed tretiranja neoplođenih cvjetova auksinom (Pevalek-Kozlina, B., 2003).

Uočena je uska korelacija između nastajanja i razvoja sjemena i plodova. Plod (fructus) je organ koji se u cvjetnjača nakon oplodnje u većini slučajeva razvija iz plodnice. Smatra se da embrio pomoću hormona auksina i giberelina stimulira razvoj sjemenki i ploda. U

plodu s većim brojem sjemenaka, svaka sjemenka osigurava hormonima određeni dio ploda.

Kako kod nekih vrsta primjenom auksina i giberelina možemo izazvati partenokarpiju, pretpostavlja se da sjemenke pomoću navedenih hormona djeluju na razvoj ploda. Budući da razvoj sjemena i ploda stimuliraju isti hormoni, možemo govoriti o hormonalnoj integraciji pri razvoju sjemena i ploda. Ustanovljeno je da značajnu ulogu u zametanju i razvoju ploda imaju auksini. Tako npr. plodovi nekih sorata limuna, vinove loze itd., koji ne sadrže sjemenke, imaju znatno veći sadržaj auksina nego plodovi u kojima se nalaze sjemenke. Smatra se da do partenokarpije dolazi zbog promjene u količinskom odnosu hormona. Tu pretpostavku potvrđuje činjenica da primjenom sintetskog auksina možemo izazvati partenokarpiju i to kod vrsta koje u prirodnim uvjetima naginju ovoj pojavi (npr. predstavnici porodice *Cucurbitaceae*, *Solanaceae*, *Vitaceae*). Partenokarpiju možemo izazvati i primjenom giberelinske kiseline (npr. kod krušaka). Budući da su partenokarpni plodovi ponekad krupniji i bez sjemenki, izazivanje partenokarpije giberelinima ima i praktično značenje.

Razvitak sjemenki može se podijeliti u dvije faze. Prvu fazu karakteriziraju stanične diobe, te razvoj embrija i tkiva endosperma. Druga faza počinje prestankom staničnih dioba, a završava dehidracijom i prekidom razvoja. Kao posljedica dehidracije prekida se metabolizam i sjemenke ulaze u stanje mirovanja. Sadržaj apscizinske kiseline je u sjemenkama tijekom ranih stadija embriogeneze vrlo nizak, nakon toga se povećava, a kako sjemenka dostiže zrelost opet se postupno smanjuje. Jedna od glavnih uloga apscizinske kiseline u sjemenkama je poticanje sinteze proteina uključenih u toleranciju isušivanja. Tijekom srednjih i kasnih stadija razvitka sjemenki, u embrijima se uz visoke razine apscizinske kiseline nakupljaju specifične mRNA koje kodiraju proteine uključene u toleranciju isušivanja. Sjemenke mnogih biljnih vrsta neće proklijati odmah nakon dozrijevanja, čak i kad su uvjeti za klijanje povoljni. Suhe dormantne sjemenke obično sadrže više koncentracije ABA nego nedormantne sjemenke. Sjemenke će proklijati kada se ABA svlada inaktivacijom, ukloni ili uslijed povećane aktivnosti giberelina. Npr. sjemenke nekih pustinskih biljaka prekidaju dormanciju kada kiša iz njih ispere apscizinsku kiselinu. Neke pak sjemenke zahtijevaju svjetlost ili neki drugi poticaj koji će pokrenuti razgradnju apscizinske kiseline. U većini slučajeva odnos razina apscizinske kiseline i giberelina određuje da li će sjemenka ostati dormantna ili će proklijati. Tijekom klijanja opažen je porast sadržaja citokinina i giberelina što je dokaz da hormonska

ravnoteža kontrolira prijelaz iz stanja dormancije u stanje klijanja (Pevalek-Kozlina, B., 2003).

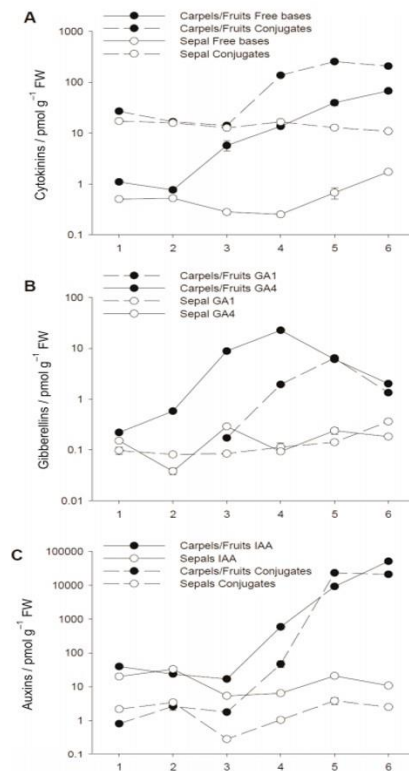
2. Metode i ideje primjenjene u studiji razvoja velevjetnog kukurijeka (*Helleborus niger* L.)

Reproduktivni razvoj velevjetnog kukurijeka (*Helleborus niger* L.) jedan je od impresivnih primjera ovakve vrste. Ovdje opisujemo reproduksijski razvoj velevjetnog kukurijeka, dajući pregled profila i dinamike endogenih biljnih hormona, raspravljajući o njihovim mogućim ulogama u pokretanju i posredovanju neuobičajene morfološke promjene cvijeta.

Budući da su morfološke promjene cvjetnih organa pod utjecajem oplodnje i razvoja ploda, dolazimo do slijedećeg zanimljivog pitanja: kako ti plodovi zapravo komuniciraju s drugim cvjetnim dijelovima, i posreduju određene promjene za vrijeme reproduksijskog razdoblja vrste *Helleborus niger*? Poznato je da je tkivo ploda bogat izvor biljnih hormona, malih signalnih molekula koje općenito koordiniraju i posreduju u razvoju biljke. Kako bi se testirala potencijalna uloga različitih biljnih hormona u razvoju cvijeta *Helleborus niger*, prvo je trebalo tretirati cvijet s nekoliko različitih predstavnika hormona auksina [IAA, 4-Cl-IAA], citokinina (BA, Z, IP, A2-izopentenil, iPR, DZ, DZR) i giberelina (GA3, GA4, GA7). Predstavnici ovih triju skupina primijenjeni su u lanolinskoj pasti, u koncentracijama od 10^{-5} do 10^{-2} mol dm⁻³, do unutrašnjih površina lapova na prašniku. Rezultati su praćeni od šest do osam tjedana nakon tretmana kada su odgovarajući dijelovi ploda dosegili "zelenu fazu" razvoja. Učinak primjene hormona bio je jasan: svi citokinini stimulirali su ozelenjavanje lapova, auksini nisu imali učinak na nakupljanje klorofila, ali su potaknuli produženje stabljike, dok su giberelini sudjelovali u oba rezultata, produživanju i ozelenjavanju. Na staničnoj razini, tretiranje hormonima utjecalo je i na obilje kloroplasta i njihovu strukturu. Lapovi tretirani citokininima i giberelinima sadržavali su sličan broj kloroplasta kao i plodonosni cvjetovi iste dobi te tipične strukture (guste strome s brojnim ribosomima, te dobro razvijenim tilakoidima). S druge strane, netretirani i auksinom tretirani lapovi, sadržavali su značajno manji broj kloroplasta s relativno providnom stromom sadržavajući rezervne ribosome i brojne plastoglobule, dok su tilakoidi bili nebrojni (Salopek-Sondi, B., 2011).

Citokinini su već dugo vremena poznati kao hormoni koji sprječavaju degradaciju klorofila ili povećavaju njegovu akumulaciju. Mnoge su studije pokazale da su citokinini uključeni u prevenciju biljnog tkiva od starenja, naročito fotosintetskog aparata. Osim toga, citokinini čuvaju integritet kloroplasta povećanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima (katalaze i askorbatne peroksidaze) i smanjenjem razine H_2O_2 . Čini se kako se uloga giberelina preklapa s ulogom citokinina; oni smanjuju razgradnju klorofila u listovima salate, te odgađaju starenje plodova citrusa. Kod brojnih vrsta dokazano je da giberelini i auksini reguliraju razvoj i produživanje stabljike cvijeta. Odstranjivanje cvijeta ili cvjetnih organa rezultiralo je inhibiranjem produživanja stabljike. Kompleksno djelovanje auksina i giberelina prilikom produživanja cvjetnih stabljika, proučavano je primjerice kod tulipana i ječma.

Analiza citokinina u cvjetnom tkivu učinjena je pomoću LC-MS / MS. Protokol temeljen na imunokromatografiji i tekućoj kromatografiji - masenom spektrometrijom otkriva prisutnost slobodnih baza (Z, DZ, iP), njihovih riboza i odgovarajućih monofosfata. Kvantifikacija citokinina je postignuta razrjeđivanjem izotopa, koristeći pritom deuterirane interne standarde. Ukupna razina citokinina značajno se povećala u plodu tijekom ranog razvoja (od "svijetlozelene" do "zelene" faze), i zatim nastavila s akumulacijom sve do posljednje istraživane faze.

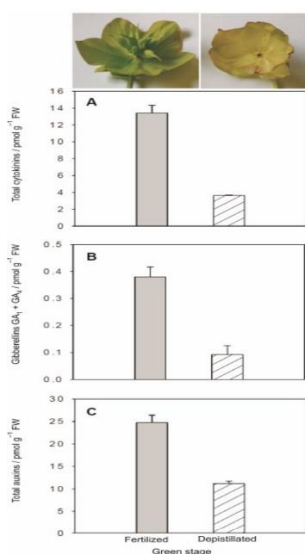


Slika 6. Faze razvoja

(Izvor: Salopek-Sondi B., 2011: Reproductive development of the Christmas rose (*Helleborus niger* L.): The role of plant hormones. *Croatica Chemica Acta* 84, 277-285)

Ukratko, najpopularniji su monofosfati (iPRMP, ZRMP, DZRMP), zatim ZR i DZR, dok su slobodne baze (Z i DHZ) najbogatije u posljednjoj analiziranoj razvojnoj fazi ("Gotovo zreloj" fazi, 2-3 tjedna prije sazrijevanja sjemena). DZ citokinini bili su nešto više zastupljeni od zeatina, no kasnije se taj omjer obrnuo, te Z i derivati postižu do sedam puta veće koncentracije. U posljednjoj razvojnoj fazi (gotovo zrelog ploda), citokinini su uglavnom lokalizirani u sjemenu (80%) u usporedbi s perikarpom (20%). Zeotinski tipovi citokinina su prvi izolirani iz nezrelih sjemenki kukuruza, no čini se da njima obiluju i plodovi i sjemenke drugih biljnih vrsta, kao što su kivi, žitarice, slanutak, itd. U tim vrstama razine citokinina dramatično se povećavaju nakon oplodnje, a zatim naglo padaju tijekom kasne faze zrenja. Ovaj vrhunac obično je koreliran sa staničnom podjelom u endospermu. Nasuprot tome, koncentracije citokinina su bile visoke u sjemenu vrste *Helleborus niger* sve do kraja razvoja. Kao što smo ranije spomenuli, razvijanje embrija kukurijeka ne napreduje dalje od rane kotiledonarne faze, dokle god je sjeme vezano na matičnu biljku. Stoga su stalno visoke razine citokinina tijekom zrelosti plodova vjerojatno

potrebne za diferencijaciju zametaka. Koncentracija slobodnih citokinina povisuje su u posljednje dvije faze razvoja, uslijed pojave intenzivne fotosinteze. Promjene su bile manje izražene nego kod plodova u razvoju, ali su se dogodile u istom vremenskom okviru. Da bi se potvrdio učinak razvijanja sjemena prilikom povišene razine citokinina u lapovima, također su analizirani i cvjetovi u „zelenoj“ fazi razvoja. Kao što se može vidjeti, ukupna razina citokinina bila je znatno niža kod besjemenih cvjetova od one kod dozrijevajućih iste dobi. Analiza citokinina u kombinaciji s rezultatima egzogenih tretmana ukazuje na to da citokinini igraju ulogu u normalnom životnom ciklusu biljke (Salopek-Sondi, B., 2011).



Slika 7. Usporedba hormona u lapovima oplodjenih cvjetova i onih bez tučka

(Izvor: Salopek-Sondi B., 2011: Reproductive development of the Christmas rose (*Helleborus niger* L.): The role of plant hormones. *Croatica Chemica Acta* 84, 277-285)

Giberelini (GAs) su tetracikličke diterpenoidne kiseline sintetizirane iz acetil CoA. Postoje dvije klase temeljene na prisutnosti 19 ili 20 atoma ugljika spojenih u četiri ili pet prstenova. 19-ugljične forme su općenito biološki aktivni giberelini. Trenutno postoji 136 GAs identificiranih iz biljaka, gljiva i bakterija. Imenovani su brojevima (GA1, GA2 itd.). Od 136 GA-a, samo je nekoliko identificirano kao aktivni hormoni (GA1, GA3, GA4, GA5, GA6 i GA7), dok drugi predstavljaju prekursore i katabolijske u metaboličkom putu GA. Smatra se da su GA sintetizirani u mladim tkivima izdanaka i sjemena u razvoju. Endogene razine giberelina u vrsti *Helleborus niger* određene su pomoću LC-MS / MS. Dva fiziološki aktivna giberelina, GA1 i GA4, te njihovi brojni prekursori i kataboliti su identificirani i kvantificirani u tkivu cvijeta i ploda tijekom njihova razvoja. Na slici 7

prikazani su dinamički bioaktivni giberelini (GA1 + GA4). Kao što se može vidjeti, razina ukupnog bioaktivnog GA počinje se povećavati nakon oplodnje ("muški" stupanj) i nastavlja se tijekom ranog razvoja ploda. Dva bioaktivna GAs različito su raspodijeljena tijekom razvoja ploda: GA4 je dosegao vrhunac tijekom razvoja embrija, a GA1 tijekom narednog perioda ubrzane akumulacije hranjivih tvari. Razina GA4 tijekom razvoja ploda dosegla je svoj vrhunac kada je ozelenjavanje lapova bilo intenzivno (od "svijetlo zelene" do "zelene" faze), pri koncentraciji od oko 100 puta većoj od one u tučku tijekom "Ženske" faze. Bioaktivni giberelini su potrebni za rast embrija i razvoj sjemeni, te se općenito nakupljaju tijekom navedenih procesa. Koncentracije giberelina u lapovima su od 2 do 50 puta niže od onih u tkivu plodova (Salopek-Sondi, B., 2011).

Auksini su indolni spojevi. Auksini postoje u biljnom tkivu kao smjesa slobodnih (obično samo 5-10%) i konjugiranih (otprilike 90-95%) oblika. IAA može biti ester vezan na različite šećere ili amid vezan na aminokiseline i peptide. Uloge navedenih konjugata uključuju skladištenje, transport, odjeljivanje, te zaštitu od degradacije i detoksifikacije. Auksini igraju bitnu ulogu u razvoju cvijeta i ploda, te sudjeluju u koordinaciji između cvjetnih organa.

Za procjenu dinamike auksina tijekom razvoja cvijeta i ploda *Helleborus niger*, endogene razine auksina utvrđene su u različitim tkivima pomoću LC-MS / MS. U plodu, auksini počinju drastično akumulirati tijekom ranog razvoja, postižući maksimum u posljednjoj fazi intenzivnog punjenja sjemeni. Kako se razvoj ploda nastavlja, količina amid konjugata se povećava prateći razinu slobodnih IAA. Oko 98% ukupnih auksina sadržanih u plodovima nastalo je u sjemenu. Među konjugatima identificiranim u plodovima najčešće nalazimo IAA-Asp i IAA-Glu. Sjemenke mnogih vrsta bogate su amidima, koji su glavni izvor aktivnih auksina u razdoblju od klijanja pa sve dok mlada sadnica ne postane sposobna za vlastitu biosintezu auksina. Morfološke promjene cvijeta *Helleborus niger* očito su regulirane kompleksnim djelovanjem barem tri skupine biljnih hormona; citokinina, giberelina i auksina. Analize endogenih hormona pokazale su da je njihova akumulacija u plodovima i lapovima čvrsto regulirana i pojavljuje se tijekom određenih razvojnih stadija. Dakle, GAs, osobito GA4 je prvi hormon povišen nakon oplodnje ("muška" faza), te dostiže vrhunac tijekom ranog razvoja ploda. Akumulacija GA1 počinje kasnije i doseže vrhunac tijekom intenzivnog rasta ploda i produživanja. Sljedeća faza razvoja ploda ("svjetlo zelena"), također je okarakterizirana povećanjem slobodnih citokinina do 10 puta. "Svjetlo zelena" faza razvoja je razdoblje diferencijacije

embrija i endosperma i intenzivne diobe stanica. Nakon toga, IAA počinje rasti tijekom razvoja plodova i sjemena (Salopek-Sondi, B., 2011).

Vremenska skala akumulacije hormona u plodovima *Helleborus niger* uglavnom je u skladu s onom promatranom za rajčice. Glavna je razlika u tome što IAA i citokinini održavaju visoku razinu u plodu kukurijeka sve do kraja razvoja, dok se znatno ranije snižavaju u plodu rajčice. Kod kukurijeka visoka razina citokinina i auksina može biti povezana s nezrelim embrijom, koji zahtjeva vrijeme prilagodbe nakon odvajanja od matične biljke da bi se postigao svoj potpuni razvoj. Hormonalne promjene u lapovima nisu tako značajne kao što su u tkivu ploda, ali sve u svemu, razina hormona je značajno niža ukoliko oplodnja nije uspjela. Dakle, koncentracije citokinina i giberelina su i do četiri puta niže, te je prisutno dvostruko manje auksina nego kod uspješno oplođenih primjeraka. Razvoj biljaka općenito se regulira kompleksnim međudjelovanjem različitih biljnih hormona. Jasno je dokazano da auksin i citokinin djeluju antagonistički. Auksin može regulirati metabolizam citokina i obrnuto.

3. ZAKLJUČAK

Fitohormoni ili biljni hormoni su organski spojevi koje biljka proizvodi da bi regulirala fiziološke procese u svom biološkom ciklusu sve od klijanja sjemena do zriobe plodova i sjemenaka. Od pet poznatih skupina biljnih hormona, tri su osnovne skupine biljnih hormona koje stimuliraju procese rasta i diferencijacije biljnih organa (auksini, giberelini i citokinini), dok ih apscizinska kiselina i etilen inhibiraju. Pri generativnom razvoju biljaka značajnu ulogu imaju hormoni koji stimuliraju rast i diferencijaciju biljnih organa, kao i njihova međusobna interakcija.

Fitohormon stimulativnog djelovanja, auksin, ima brojne fiziološke učinke među kojima su i odgoda otpadanja listova i plodova u ranijim fazama razvoja, te poticanje razvitka ploda i indukcija partenokarpije. Osim prirodnih, danas se proizvode i brojni sintetski auksini koji se koriste za ubrzavanje zriobe plodova, sprečavanje otpadanja plodova prije dozrijevanja, te kao herbicidi.

Drugi fitohormoni stimulativnog djelovanja su giberelini čiji su važni fiziološki učinci stimuliranje rasta plodova i indukcija partenokarpije. Oni omogućuju promjenu odraslog u juvenilno stanje ili juvenilnog u odraslo stanje, utječu na prekid dormancije

sjemenki i indukciju klijanja. U komercijalnoj upotrebi sintetski preparati na bazi giberelina koriste se u oplemenjivanju (u četinjača ubrzavaju ulazak u reproduktivnu fazu).

Citokinini su treći fitohormoni stimulativnog djelovanja čiji je važan fiziološki učinak odgoda starenja listova i mobilizacija hranjivih tvari, poticanje rasta bočnih pupova, povećanje stanica u kotiledonima i listovima, te povećanje tolerancije biljaka prema visokim i niskim temperaturama i gljivičnim infekcijama.

Etilen je fitohormon inhibitornog djelovanja koji kontrolira procese karakteristične za završne razvojne stadije brojnih fizioloških učinaka. Etilen utječe na dozrijevanje plodova, starenje listova i cvjetova, otpadanje listova, prekid dormantnosti sjemenki i pupova, produžni rast submerzalnih biljaka, indukciju stvaranja adventivnog korijena, te inhibira cvjetanje kod većine biljnih vrsta.

Apscizinska kiselina je fitohormon inhibitornog djelovanja koji također kontrolira procese karakteristične za završne razvojne stadije i rast u uvjetima vodnog stresa. Fiziološki učinci apscizinske kiseline su brojni: ubrzavanje apscizije (plodova, listova), indukcija i produživanje mirovanja u izdancima listopadnog drveća, inhibicija klijanja putem produženog mirovanja, mirovanje embrija, dormantnost sjemenki, dormantnost pupova, starenje i otpadanje listova i plodova.

Reproduktivni razvoj velecvjetnog kukurijeka (*Helleborus niger* L.) jedan je od rijetkih ovakvih primjera: nakon oplodnje bijeli cvjetni omotač postaje zelen, fotosintetski aktivan i traje tijekom razvoja ploda. Nedostatak razvijenog ploda uzrokuje određenu inhibiciju morfoloških promjena kao što su ozelenjavanje lapova i produženje stabljike. Profil i dinamika tri glavne skupine biljnih hormona (citokinina, giberelina i auksina) ispitivani su pomoću LC-MS / MS u cvjetnim tkivima tijekom razvoja *Helleborus niger*. Plodovi, posebice sjeme, bogat su izvor sve tri skupine biljnih hormona koji, kroz složenu međusobnu suradnju, koordiniraju razvoj drugih cvjetnih dijelova.

Usprkos dugogodišnjim i brojnim istraživanjima mnogih znanstvenika diljem svijeta, djelovanje fitohormona na biljke još uvijek nije još u potpunosti istraženo, te nam ostavlja prostor za brojna intrigantna otkrića.

4. LITERATURA

1. Dubravec, K. D., Regula, I., 1995: Fiziologija bilja. Školska knjiga, Zagreb
2. Maček, I., 2017: ULOGA APSCIZINSKE KISELINE KOD DORMANTNOSTI, diplomski rad, preddiplomski, Agronomski fakultet, Zagreb
3. Öpik, H.; Rolfe, S., 2005: The Physiology of Flowering Plants, 4th edition. Cambridge University Press, England
4. Pevalek-Kozlina, B., 2003: Fiziologija bilja. Profil, Zagreb
5. Salopek-Sondi B., 2011: Reproductive development of the Christmas rose (*Helleborus niger* L.): The role of plant hormones. *Croatica Chemica Acta* 84, 277-285
6. Škvorc, Ž.; Sever, K.; Franjić, J.; 2013: Fiziologija šumskog drveća, interna skripta. Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 85-88. Zagreb

INTERNETSKE STRANICE:

7. Službena stranica Gnojdba.info:
<http://www.gnojdba.info/biostimulatori/fitohormoni-apscizenska-kiselina/>
8. Službena stranica The Internatinal Plant Growth Substances Association:
<https://pages.wustl.edu/ipgsa>
9. Wikipedia:
https://en.wikipedia.org/wiki/Plant_hormone
10. Službena stranica Znanje.org:
<http://www.znanje.org/index.html>